



Universitat Autònoma de Barcelona

Unitat de projectes de Ciències Ambientals

**Control biològic del *Rhynchophorus ferrugineus* a partir de
diferents soques de nemàtodes entomopatògens i la seva
problemàtica a Catalunya**



Autor: Joan Sarsanedas Palau
Directors: Fernando Garcia del Pino
Ana Morton Juaneda

6 de setembre de 2010

AGRAIMENTS

Agraeixo l'ajuda dels meus tutors Fernando Garcia del Pino i Ana Morton, per haver acceptat i dirigit el meu projecte de final de carrera. A les empreses RIBAS, CESPA i FITONATUR, per a la seva col·laboració en la tala de palmeres afectades per aconseguir els exemplars vius de morrut necessaris per realitzar els assajos. Al senyor Jesús Altabella, tècnic del Departament d'Agricultura de la Generalitat de Catalunya, per atendre'm i facilitar-me informació actualitzada sobre la situació de la plaga a Catalunya. I finalment, a la meua família i amics, per la seva col·laboració totalment desinteressada en el treball de camp. Moltes gràcies a tots.

ÍNDEX

	<u>Pag.</u>
1.- Introducció	4
1.1.- El morrut de les palmeres.....	6
1.1.1.- Biologia	9
1.1.1.1.- Cicle biològic	9
1.1.1.2.- Influència de la temperatura en el desenvolupament del morrut de les palmeres.....	11
1.1.1.3.- Fenologia.....	13
1.2.- Problemàtica de la plaga	15
1.3.- Mètodes de control	16
1.4.- Objectius	23
2. Susceptibilitat del <i>Rhynchophorus ferrugineus</i> als nemàtodes entomopatògens.	24
2.1.- Materials i mètodes	24
2.2.- Resultats	26
2.3.- Discussió	27
3. Avaluació de la depredació <i>Steinernema carpocapsae</i> a partir de l'àcar <i>Centroupeda almerodai</i> present sota els èlitres de l'adult de <i>Rhynchophorus ferrugineus</i>	30
3.1.- Materials i mètodes	31
3.2.- Resultats	32
3.3.- Discussió	33
4.- Conclusions	35
5.- Pressupost.....	36
6.- Bibliografia	37

1.- Introducció

La pèrdua de biodiversitat és una de les problemàtiques més greus a nivell mundial. La fragmentació d'hàbitats, el canvi climàtic, l'ús insostenible dels recursos naturals i l'aparició d'espècies invasores, han contribuït a un augment significatiu de la taxa de pèrdua de biodiversitat. Avui en dia l'abundància d'espècies ha disminuït considerablement: un de cada quatre mamífers, una de cada vuit aus, un terç dels amfibis i el 70% de les plantes descrites en la llista vermella de UICN (Unió Internacional per la Conservació de la Naturalesa) es troben en perill (UICN, 2008).

Les espècies invasores representen una amenaça sèria en la biodiversitat en moltes comunitats ecològiques. Actualment les espècies invasores són el segon factor més important en la pèrdua de biodiversitat després de la destrucció d'hàbitats (UICN, 2008). Un ecosistema és un sistema natural que està format per un conjunt d'organismes vius que es relacionen entre si dins del mateix espai físic. En un ecosistema es pot trobar espècies que són autòctones i espècies que són al·lòctones. S'entén per espècie autòctona aquella que procedeix de la mateixa àrea que habita, almenys des de temps històric. En canvi, l'espècie al·lòctona és aquella que procedeix d'una zona biogeogràfica diferent, separada geogràficament i que com a conseqüència de l'acció antròpica, ha superat la barrera d'aïllament que impedia la connexió (Sanz-Elorza et al. 2005). Quan una espècie al·lòctona s'adapta a les condicions biòtiques i abiòtiques del nou hàbitat, sent capaç de créixer i reproduir-se, esdevé una espècie naturalitzada. Si també es capaç d'estendre's ràpidament pel territori formant noves poblacions independents de la original, aleshores esdevé invasora (Sanz-Elorza et al. 2005).

Els impactes de les espècies invasores són greus i afecten a nivells ecològic, econòmic i sanitari. De fet, les espècies invasores poden competir amb les autòctones, comportar-se com a plagues o patògens per les espècies conreades o domèstiques, o inclús disseminar els agents al·lèrgics o infecciosos (UICN, 2008). A nivell ecològic produeixen alteracions en la dinàmica i estructura d'un ecosistema, que genera una modificació d'aquest amb conseqüències per a la supervivència de determinades espècies, tant de vegetals com animals, arribant a afectar espècies endèmiques estenòcores que pot ocasionar la seva rarificació i posterior extinció (Sanz-Elorza et al. 2005).

La principal via d'entrada de les espècies invasores és a través de l'acció antropogènica, de forma intencionada o accidentalment, a través del transport mundial ja sigui per terra, mar o aire (UICN, 2008). Les causes d'introducció d'espècies invasores són diverses: alliberament voluntari, introducció accidental, introducció d'una espècie al·lòctona voluntària que porta associada un altre de nociva que s'introdueix involuntàriament. L'alliberament d'animals de companyia al medi natural genera competències amb les espècies autòctones existents que pot ocasionar una disminució de la seva població. És el cas de la tortuga de florida (*Trachemys scripta elegans*) abandonada en rius i altres ambients aquàtics on competeixen amb les tortugues d'aigua autòctones (*Mauremys leprosa*) i la tortuga d'estany (*Emys orbicularis*). Un cas d'introducció accidental es va produir a l'Oceanogràfic de Mònaco on petits fragments de l'alga assassina (*Caulerpa toxifolia*) va escapar al medi marí formant noves colònies. Actualment s'està estenent pel Mediterrani occidental desplaçant i aniquilant praderies marines de fanerògames com la Posidònia (*Posidonia oceanica*). El cas del Silur (*Silurus glanis*) es va introduir amb finalitats esportives al pantà de Mequinensa-Ribaroja, on posteriorment s'ha estès per l'Ebre i s'ha trobat exemplars en la conca del Ter, concretament en el pantà de Sau i el de Susqueda. Aquest depredador de gran mida i voracitat és el responsable de la disminució de l'abundància i supervivència de les poblacions de peixos autòctons i altres vertebrats. El mol·lusc més problemàtic dels rius catalans és el musclo zebra (*Dreissena polymorpha*) que es va introduir involuntàriament a través de les quilles dels vaixells que procedien de la regió del mar Negre, Casp i Aral. La seva ràpida reproducció, amb una nova posta cada mes i el ràpid creixement dels individus permeten una gran dispersió creant poblacions molt denses (4000 individus per m²). És una espècie filtradora, fet que provoca una disminució important del plàncton, afectant d'aquesta manera a tots els organismes aquàtics que en depenen i de retruc a l'economia basada en la seva pesca. A part de les conseqüències ambientals, cal destacar les pèrdues econòmiques a les instal·lacions hidroelèctriques i en els sistemes d'abastament d'aigua potable i de reg. L'espècie vegetal invasora més coneguda al territori català és el bàlsam o dits de bruixa (*Carpobrotus edulis*), introduïda al segle XVIII procedent del sud d'Àfrica per la seva bellesa com a planta ornamental. La seva distribució s'estén al llarg de tot el litoral Mediterrani. És una planta amb un ràpid creixement horitzontal, que competeix directament amb altres espècies autòctones en la colonització de nous territoris de cingleres, dunes i arenals. A vegades una espècie al·lòctona introduïda voluntàriament porta associada un altre de nociva que s'introdueix involuntàriament. La

forta urbanització de finals del segle passat a la costa Mediterrània, ha afavorit la importació massiva de palmeres de l'espècie canària (*Phoenix canariensis*) i la datilera (*Phoenix dactylifera*) procedents d'Egipte amb finalitats ornamentals i paisatgístiques. Degut a la falta de controls fitosanitaris moltes palmeres van arribar infestades pel morrut de la palmera (*Rhynchophorus ferrugineus*), que produeix danys importants a les palmeres, ocasionant fins i tot la mort. En els darrers anys s'ha convertit en una greu plaga estesa per la costa Mediterrània i les Illes Canàries, que ha generat pèrdues econòmiques. Afecta a les comunitats naturals de *P. canariensis* a les Illes Canàries i al palmeral d'Elx a la Comunitat Valenciana, dues zones amb un gran interès medioambiental.

1.1.- El morrut de les palmeres

El morrut de les palmeres, *R. ferrugineus* (Olivier, 1790), és un coleopter de la família Dryophthoridae. És originari de les regions tropicals del sud-est asiàtic i Polinèsia, en països com l'Índia, Filipines, Pakistan, Indonèsia, Vietnam, Japó, Xina i Tailàndia.

La seva via de propagació arreu del món va ser a través del comerç d'exemplars infestats. La seva expansió va començar fa 25 anys atacant a palmeres datileres dels països del sud d'Àsia, Península Aràbiga i Iran. L'any 1993 va arribar a Egipte i al nord d'Àfrica i a partir del comerç de palmeres datileres malaltes procedents d'Egipte va entrar a Europa afectant a Itàlia, França, Portugal i Espanya (Gobierno de Canarias, 2006). El primer focus d'infestació a Espanya es va detectar l'any 1993 a Motril i Almuñécar (costa de Granada, Andalusia) (Barranco et al. 1995, 1996a). Les autoritats van declarar oficialment l'existència de la plaga l'any 1995. Fins l'any 2000 l'espècie va quedar localitzada a les poblacions costaneres de Motril, Salobreña, Almuñécar, Nerja, Frigiliama i Torrox (Junta de Andalucía 1999, 2000). El fort creixement urbanístic al litoral Mediterrani, va fer que augmentés la demanda de palmeres per a enjardinar tant espais públics com privats. Les palmeres que es van importar eren les palmeres datileres procedents d'Egipte, on la infestació estava totalment descontrolada (Altabella, comunicació personal). Gràcies a la difícil detecció, les palmeres van superar els controls fitosanitaris vigents i el morrut va establir-se en la Península. La primera acció del govern Espanyol per combatre la plaga va ser la prohibició del comerç de les

palmeres. D'aquesta manera es frenava l'entrada del morrut i es facilitava la lluita contra els focus ja existents. La Unió Europea va pressionar l'Estat Espanyol perquè tornes a permetre el comerç de palmeres argumentant que no es pot prohibir el lliure comerç de qualsevol material dins de la Unió Europea i, en tot cas, es poden endurir els controls fitosanitaris per evitar l'entrada de material contaminat (Altabella, comunicació personal). L'any 2000 el Ministeri d'Agricultura va modificar l'ordre del 1996 i va tornar a autoritzar la importació de palmeres procedents d'Egipte argumentant que “los avances en el conocimiento de *Rhynchophorus ferrugineus* y de los tratamientos de control de sus poblaciones” (Ferry, 2006). L'any 2004 van aparèixer els primers focus a la Comunitat Valenciana i l'any 2005 a la regió de Múrcia i a les Illes Canàries (Cabello, 2006).

El primer focus de morrut de les palmeres a Catalunya va ser el novembre de l'any 2005 al Vendrell (Baix Penedès), i al llarg del 2006 es van seguir detectant palmeres malaltes aïllades per la Comarca. La Generalitat de Catalunya va declarar oficialment l'existència de la plaga al territori català el 3 de juliol del 2006. Les primeres captures daten del juliol del 2006 a Cabrils (Maresme). Un mes després es va localitzar el segon focus a Vilassar de Mar (Maresme). Al setembre del 2006 es van realitzar captures a Gavà (Baix Llobregat). El tercer focus es va detectar a l'octubre del 2006 a Pineda de Mar (Maresme). El quart focus va aparèixer al desembre del 2006 a Vilanova i la Geltrú (Garraf) i a finals del mateix mes es va localitzar el cinquè a Riudoms (Baix camp) (Departament d'Agricultura de la Generalitat de Catalunya, 2010). A partir del 2007 la plaga s'estén amb rapidesa i el número de palmeres afectades (figura 1) augmenta, de 356 exemplars a finals de l'any 2006 fins a 4748 exemplars a finals del 2009 (Departament d'Agricultura de la Generalitat de Catalunya, 2010).

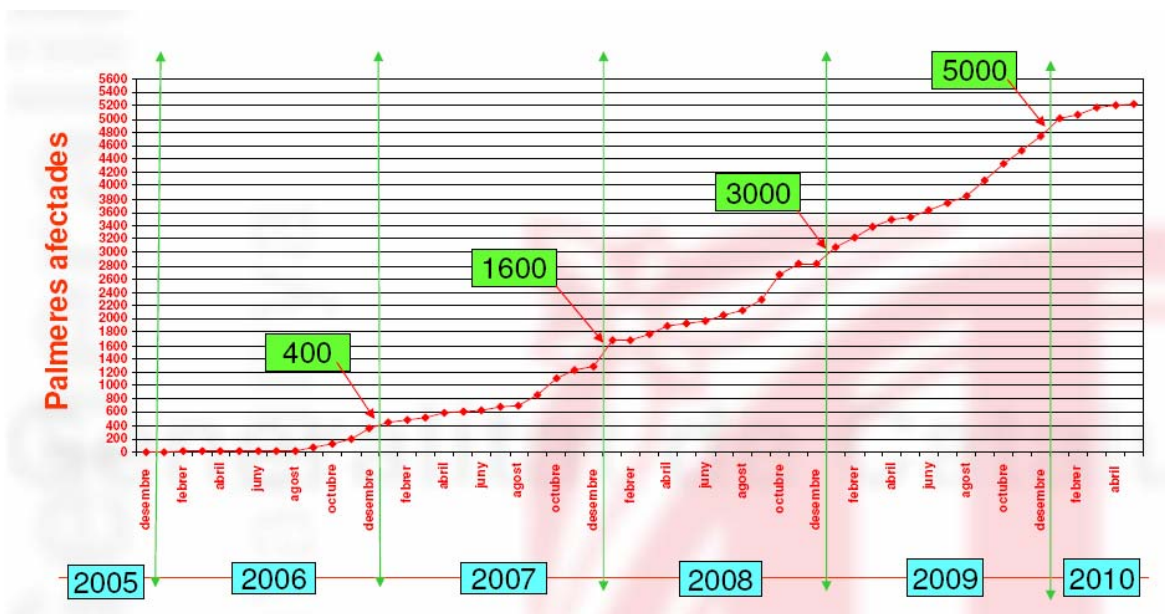


Figura 1: Evolució de la plaga a Catalunya els darrers anys (Departament d'Agricultura de la Generalitat)

Actualment hi ha censades a Catalunya 5.001 palmeres infestades pel *R. ferrugineus*. De les 4 espècies de palmeres que s'han trobat infectades, la més susceptible és la palmera canària (*P. canariensis*) amb un 99,68% (taula 1). La palmera datilera (*P. dactylifera*) encara que va ser la portadora de la plaga, no es veu gaire afectada a causa que el morrut és atret per la palmera canària i només representa el 0,24%. Les espècies menys susceptibles amb un 0,04% d'infestació, són la *Trachicarpus fortunei* i la *Washingtonia robusta* (Departament d'Agricultura de la Generalitat de Catalunya, 2010).

Taula 1: susceptibilitat de les diferents espècies a l'atac del morrut de les palmeres (*Rhynchophorus ferrugineus*).

ESPÈCIE	INDIVIDUS	%
<i>Phoenix canariensis</i>	4.985	99,68
<i>Phoenix dactylifera</i>	12	0,24
<i>Trachicarpus fortunei</i>	2	0,04
<i>Washingtonia robusta</i>	2	0,04

L'última actualització sobre l'evolució del morrut a Catalunya, realitzada el 31 de juliol del 2010 (figura 2), mostra que la plaga és present en les comarques del Baix Camp, Alt Camp, Tarragonès, Baix Penedès, Alt Penedès, Garraf, Baix Llobregat, Barcelonès, Vallès Occidental, Maresme, Vallès Oriental, La Selva, Gironès, Baix Empordà i Alt

Empordà; amb un total de 124 municipis afectats amb 5244 exemplars de palmeres malaltes (Departament d'Agricultura de la Generalitat de Catalunya, 2010).

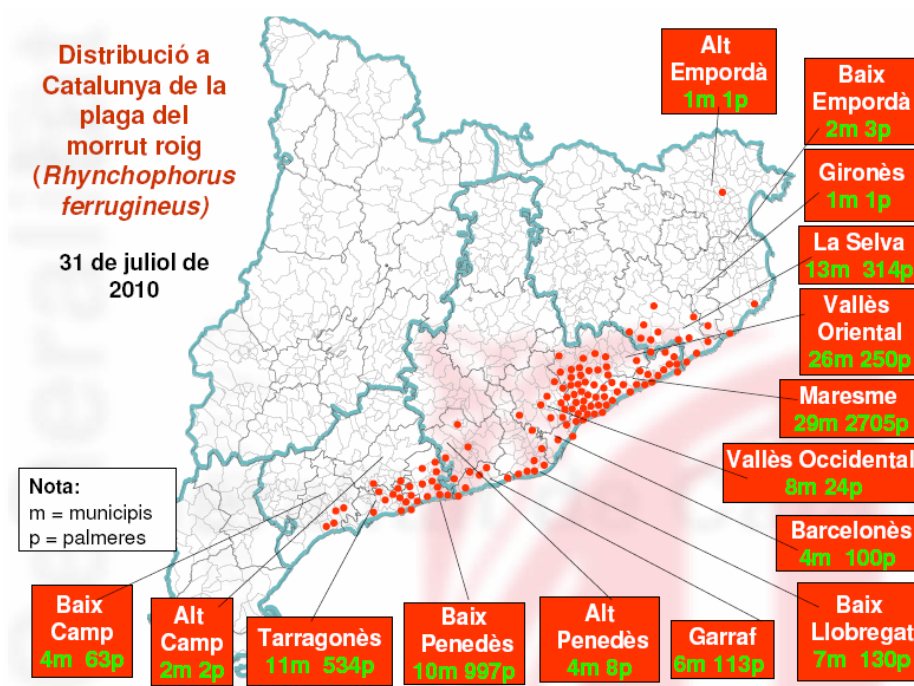


Figura 2: Distribució de *R. ferrugineus* el 31 de juliol del 2010 a Catalunya (Departament d'Agricultura de la Generalitat, 2010).

1.1.1.- Biologia

1.1.1.1.- Cicle biològic

El cicle biològic complet del morrut de les palmeres té una durada de 3 a 4 mesos (Vives i Garcia, 2006). L'adult (figura 3) mesura entre 2,5 i 5 cm de llargada amb un promig de 3,4 cm, de coloració marró oxidat, variable dins de la mateixa espècie. Mostra un rostre allargat, prominent i corbat en la part davantera. El mascle presenta una panotxa de pèls de color cafè en la part llarga de la cara dorsal del rostre. Té un tòrax més llarg que ample, amb un solc transvers-anterior, estret de darrera cap endavant, amb la vora posterior lleugerament arrodonida. En el protòrax presenta unes taques negres molt visibles, de mida i formes diverses. Al llarg dels èlitres destaquen unes línies estriades, també de color negre (Barranco et al., 1995). Sota els seus èlitres s'han localitzat la presència d'àcars de l'espècie *Centrouropa almerodai*. La vida mitjana oscil·la entre els 45 i 90 dies (Gobierno de Canarias, 2006).



Figura 3: Adult de *R. ferrugineus*

La copula té lloc en qualsevol moment del dia. El mascle i la femella s'aparellen moltes vegades durant la seva vida. Si en la palmera hi ha suficient aliment per garantir una altre generació, la femella diposita els ous en la mateixa palmera; en cas contrari, l'adult abandona la palmera i busca un altre per colonitzar (Ferry i Gomez, 2002). Les palmeres ferides per causes naturals o per poda, desprenen unes feromones anomenades kairomones que atrauen a l'escarabat. Quan l'escarabat arriba a una nova palmera, segrega un altre feromona d'agregació per atraure més individus adults (Ferry i Gomez, 2002) (Gobierno de Canarias, 2006).

Les femelles realitzen postes de 300 a 400 ous en el transcurs de 2 a 4 dies (Vives i Garcia, 2006). L'ou es diposita de manera independent o conjunta, sense arribar a tocar-se, a l'interior d'escletxes o en petites càmeres en forma de forat realitzats per la femella on queda fixat i protegit amb una secreció. L'ou, mesura de 1 a 2,5 mm, té forma ovalada i és de color blanquinós o groc clar (Junta de Andalucía 1999, 2000).

Els ous eclosionen en 3 dies i augmenten de mida abans de l'eclosió (Raginald, 1973). La larva (figura 4) és de color blanc cremós, i va adquirint una tonalitat més fosca a mesura que avança el cicle. La larva es clarament àpode, allargada, segmentada i amb un cap endurit format per quitina de color marró provista d'unes fortes mandíbules. El període larvari precisa d'1 a 3 mesos per completar-se i està influenciat per la temperatura, i el substrat alimentari (Barranco et al., 1999b; Martín i Cabello, 2005). La larva s'alimenta del teixit vegetal intern de la palmera i, com a conseqüència, deixa una sèrie de canals o galeries internes que poden arribar al metre de longitud. És la fase que més danys causa a la palmera.



Figura 4: larva de *R. ferrugineus*

Al final del període larvari, la larva crea una cobertura de forma ovalada (figura 5) a partir de les fibres de l'interior de la palmera, que tenen una longitud de 4 a 6 cm i es localitzen en les bases de les fulles o en la base de la palmera. La fase de pupació dura de 15 a 30 dies. Passat aquest període, l'adult emergeix de l'embolcall pupal i roman a l'interior del capoll entre 5 i 17 dies (Menon i Pandalai, 1960). Segons Hutson (1933), el morrut madura sexualment durant aquest període d'inactivitat.



Figura 5: A l'esquerra el capoll fet a partir de les fibres de l'interior de la palmera. A la dreta l'aspecte d'una pupa.

1.1.1.2.- Influència de la temperatura en el desenvolupament del morrut de les palmeres

Les dades s'han extret de dos estudis sobre l'efecte de la temperatura en el desenvolupament de *R. ferrugineus*. El primer estudi realitzat per Cabello (2006), avalua l'efecte sobre els diferents estadis en condicions de laboratori i amb dieta artificial a les temperatures de 15, 20, 25, 30, 35 i 40°C. El segon treball (Cabello, 2006)

estudia l'efecte de temperatures baixes (0, 5 i 10°C, aplicats en 7 o 30 dies) en els estadis d'ou, larva i pupa.

S'ha determinat 10°C com temperatura mínima letal per l'ou (Taula 2) (Martin y Cabello, 2005a). L'únic valor fiable disponible, en condicions controlades, que determina la temperatura màxima letal és el senyalat per El-Ezaby (1997) de 40°C.

Taula 2: Llindars mínims i màxims de supervivència de diferents estadis de *R. ferrugineus* (Martin i Cabello, 2005a).

ESTADI	PARÀMETRE	VALORS (°C)
Ou	Temperatura letal inferior	10
	Temperatura letal superior	40
Larva	Temperatura letal inferior	5
	Llindar mínim de desenvolupament	15
	Llindar màxim de desenvolupament	38
	Temperatura letal superior	40
Pupa	Temperatura letal inferior	0
	Llindar mínim de desenvolupament	13
	Llindar màxim de desenvolupament	44-45

Per l'estadi larvari les temperatures extremes de 15 i 40°C (taula 2), no s'ha completat el desenvolupament dels exemplars. A 40°C cap larva nounada va poder arribar a l'estat de pupa (Martin et al., 2001b; Martin i Cabello, 2005b). A 15°C; la majoria moren en un període de temps màxim a 68 dies, encara que s'ha trobat una minoria que es capaç de sobreviure passant per 11 estadis (Martin i Cabello, 2005b). Per sota dels 15°C les larves no sobreviuen (Martin et al., 2001c). Entre aquestes temperatures extremes, la larva es pot desenvolupa i el període de temps necessari va en funció de la temperatura. A 30°C el desenvolupament és òptim i es completa amb 70 dies que està molt per sota dels 203 dies que són necessaris a 20°C (Martín et al., 2001b; Martin i Cabello, 2005b).

Per l'estadi pupal, el rang de temperatures pel seu desenvolupament va entre els 13°C (Taula 2) (Martín i Cabello, 2005a) i entre 44-45°C (Salama et al., 2002). La temperatura letal inferior és de 0 graus, per sota zero cap pupa sobreviu (Martín i Cabello, 2005 a). El desenvolupament de la pupa és òptim als 35°C i es completa amb 14 dies. A 20°C el desenvolupament és lent completant-se als 46 dies (Martín et al., 2001b; Martin i Cabello, 2005b).

Per l'estadi adult, la femella presenta major longevitat a 20°C (200 dies) que no a 35°C (75 dies). El mascle sempre presenta major longevitat que la femella, encara que també disminueix amb l'augment de la temperatura passant de 280 dies (20°C) a 97 dies (35°C). La fertilitat de la femella es veu afectada per la temperatura sent màxima a 20 i 25°C (348 i 363 ous per femella) i cau dràsticament a les temperatures més elevades: 30 i 35°C (75 i 71 ous per femella) (Martin i Cabello, 2005b).

1.1.1.3.- Fenologia

El *Rhynchophorus ferrugineus* és un insecte que està actiu tot l'any. Com a mínim, pot haver 3 generacions dins la palmera ja que la durada del cicle biològic és de 3 a 4 mesos, per aquest motiu, es possible trobar-se tots els estadis de desenvolupament en un moment determinat dins la palmera (Gobierno de Canarias, 2006).

Un factor a tenir en compte en la fenologia de l'insecte, és el grau d'infestació, ja que les condicions a l'interior de la palmera són diferents, influint així en la biologia i la capacitat de supervivència de l'espècie. Quan el nivell d'infestació és elevat, amb un número important de larves, existeixen dins la palmera processos de fermentació que fan pujar la temperatura fins a 30°C, fins i tot en els mesos d'hivern, permetent la supervivència del morrut (Esteban Duran et al., 1998). A baix nivell d'infestació, amb un número baix de larves, no existeixen processos de fermentació i la temperatura interior es baixa alentint el desenvolupament de les larves i a l'hivern fins i tot poden matar-les (Barranco et al., 2001; Martin i Cabello, 2005b).

A partir de l'any 2007, el Servei de Sanitat Vegetal del Departament d'Agricultura de la Generalitat de Catalunya fa el seguiment diari de la població a partir dels adults capturats en els paranys (figura 7). Durant els mesos d'hivern no hi ha captures perquè els adults es queden dins la palmera, ja que el fred les mataria. A partir de març, les temperatures es suavitzen i el nombre d'adults capturats comença augmentar. Durant tota la primavera i a principis d'estiu, el nombre es manté constant arribant al pic màxim en els mesos d'octubre i novembre on es poden capturar 6 individus per dia i trampa. L'augment sobtat d'adults lliures coincideix amb el pic màxim de detecció de noves

palmeres infestades, és a dir, aquelles on la corona ja s'ha aixafat (figura 8). Aquest pic disminueix bruscament amb l'entrada de l'hivern.

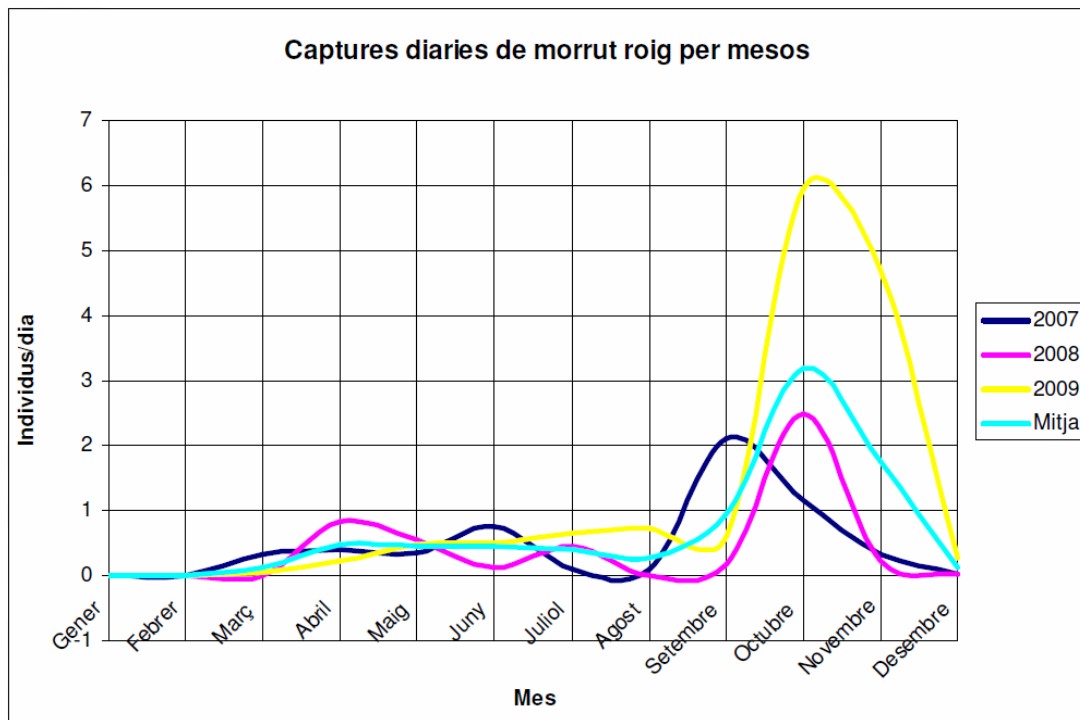


Figura 7: Captures diàries de morrut per mesos (Departament d'Agricultura de la Generalitat, 2010).

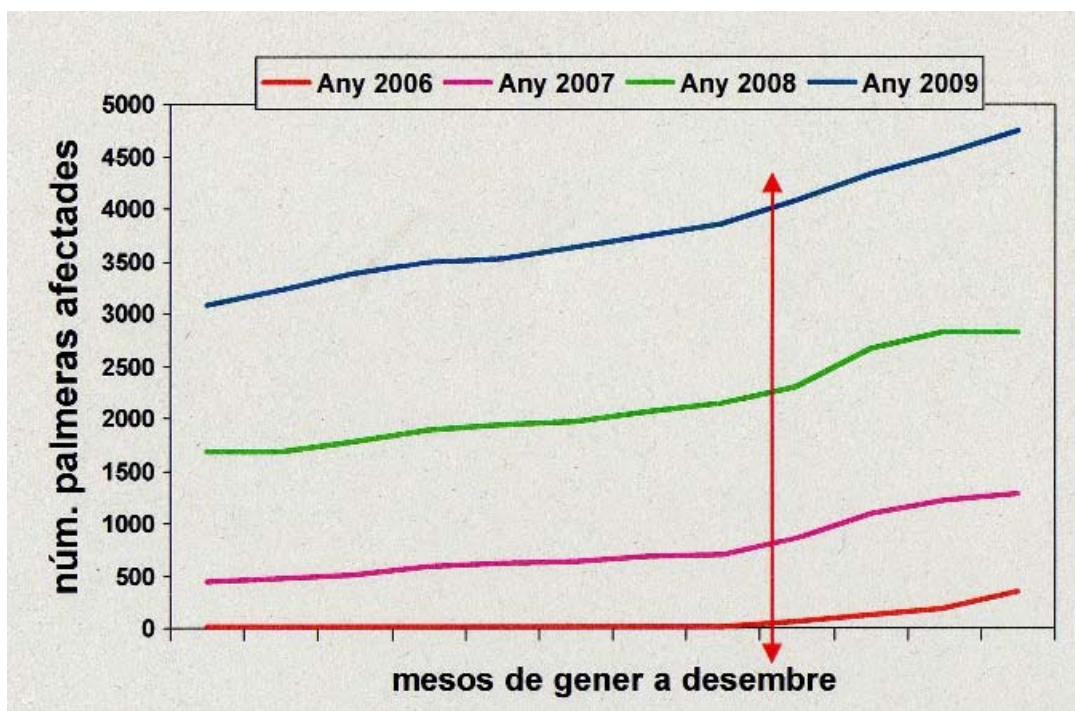


Figura 8: Número de palmeres afectades per mesos (Departament d'Agricultura de la Generalitat, 2010).

1.2.- Problemàtica de la plaga

El *Rhynchophorus ferrugineus*, infesta un gran número d'espècies de palmeres de la família Arecaceas, ocasionant la mort dels exemplars quan l'infestació es troba en fase avançada. La larva és l'estadi que més dany infligeix a la palmera degut a la seva voraç alimentació del teixit intern de la palmera. Excava nombrosos galeries des de la corona fins l'ull de la palmera lloc on s'alimenten. Quan l'ull de la palmera està molt afectat, la palmera ja no produeix noves fulles, les fulles velles s'assequen i al no ser capaç de fer la fotosíntesis la palmera acaba morint.

Les espècies de palmeres atacades a l'Estat Espanyol són la palmera canària (*Phoenix canariensis*) i a la palmera datilera (*Phoenix dactylifera*) (Gobierno de Canarias, 2006). La majoria dels exemplars d'aquestes dos espècies presents al territori s'han introduït amb finalitats tant ornamentals com econòmiques (per la producció i venda de dàtils)

La palmera canària és una espècie endèmica de les Illes Canàries que pertany a la família Arecaceae. Es formen poblacions espontànies en valls i barrancs, sent un dels elements més representatius de la biodiversitat i paisatge canari. Està present en 145 espais protegits en les diferents illes que representa el 40% del territori de l'Arxipèlag (Gobierno de Canarias, 2006). La palmera datilera és troba de forma autòctona en el palmeral històric d'Elx. Quan els musulmans van fundar la ciutat, es van convertir en camps de conreu i s'han anat explotant al llarg dels segles fins que va deixar de ser rentable. Va ser declarat patrimoni de la Humanitat per l'UNESCO (Organització de les Nacions Unides per l'Educació, la Ciència i la Cultura) l'any 2000. Actualment el palmeral està integrat dins de la xarxa urbana de la ciutat i alguns dels seus horts s'han transformat en parcs públics i d'altres s'exploten per extraure dàtils i per la fabricació de la palma blanca, destinada a celebracions religioses. Per garantir la conservació del palmeral es va crear el Centre d'Investigació de la Palmera Datilera, l'estació Phoenix, que té com a finalitat la recerca de millors mètodes naturals per assegurar la seva conservació (Ajuntament d'Elx, 2000). Aquests dos patrimonis estan amenaçats per la introducció del morrut de les palmeres (Ferry i Gómez, 2006). Les poblacions de margalló (*Chamaerops humilis*), palmera protegida i autòctona present en tota la costa occidental Mediterrània, no es veu atacada pel morrut de les palmeres gràcies a un

mecanisme de resistència que segrega una substància gomosa que asfixia o expulsa la larva, segellant la galeria i cicatritzant la ferida (Barranco et al., 2000).

Simptomatologia

Els primers símptomes en aparèixer són la presència de folíols i raquis depredades pels adults quan s'obren pas a la base de la corona. Aquests primers danys costen de veure degut a l'exuberància de la corona però són visibles si s'examina detalladament l'exemplar. Quan la infestació es important (figura 9), les fulles externes cauen i es pot observar en la base l'existència de galeries i de capolls. Comencen a decaure les fulles més tendres de la panotxa central que viren de color groc al vermell on finalment acaba amb el aixafament de tota la corona de fulles.



Figura 9: Aspecte d'una palmera Canària (*P. canariensis*) atacada per *R. ferrugineus*.

1.3.- Mètodes de control

Donades les característiques i peculiaritats d'aquesta plaga, es necessària una estratègia de control integrat que consideri distints aspectes de prevenció i de control de forma

conjunta i complementària. El Servei de Sanitat Vegetal del Departament d'Agricultura de la Generalitat de Catalunya, ha desenvolupat un protocol d'actuació que recau en els ajuntaments, particulars, jardineros professionals i viveristes, per tal de contenir i erradicar la plaga del territori. En el cas dels viveristes, el protocol prohibeix la comercialització i moviment de palmeres amb símptomes de la plaga i també d'aquelles sense passaport fitosanitari de la Comunitat Europea. És obligatori complir la legislació vigent Europea respecte a la introducció de palmeres de països amb la presència de plaga. Obliga també a protegir físicament o aplicar tractament fitosanitaris a aquells exemplars sospitosos o malalts. D'altra banda els ajuntaments, particulars i jardineros professionals segueixen un altre protocol. Els ajuntaments dels municipis afectats estan obligats a fer una prospecció periòdica de tots els exemplars de palmeres i en aquelles que es sospiti, inspeccionar-les a fons per confirmar-ne o no la seva presència. A partir de les dades obtingudes s'elabora un inventari on s'indica l'espècie de palmera malalta, la seva ubicació, la presència de plaga o de símptomes i si es de titularitat privada o pública. Un cop detectades les palmeres afectades estan obligats a combatre la plaga amb els diferents mètodes existents: els mètodes biorracionals, els mètodes químics i els mètodes biològics (Departament d'Agricultura de la Generalitat de Catalunya, 2010).

Els mètodes biorracionals emprats es basen en la col·locació de trapes amb feromones anomenades kairomones. Les kairomones són segregades a partir de les ferides de les palmeres causades per les podes o per causes naturals. Quan una palmera infestada mor o no pot albergar la següent generació, els adults abandonen la palmera i, són atrets per les kairomones d'altres palmeres sanes. Allà els mascles emeten una feromona d'agregació, anomenada ferrugineol, que atrau més mascles i femelles per fer efectiva la colonització (Ferry i Gomez, 2002). Per minimitzar l'alliberació massiva d'aquestes feromones a l'ambient, l'administració només permet realitzar podes o altres activitats que puguin causar ferides entre els mesos de novembre i febrer, quan la taxa de dispersió és molt baixa. Les ferides ocasionades s'han de tapar amb cola natural per evitar la propagació de les kairomones i s'ha de tractar la palmera amb productes fitosanitaris (Departament d'Agricultura de la Generalitat de Catalunya, 2010).

Utilitzant les propietats d'aquesta feromona s'ha dissenyat un sistema de trapes per controlar la plaga. Els adults, atrets per les kairomones, es queden atrapats dins les trapes, impossibilitant així la seva dispersió i colonització. També s'han dissenyat trapes que contenen la síntesis de ferrugineol (feromona d'agregació dels mascles).

Abraham et al. (1999) van trobar que la captura del morrut només és eficaç si la feromona s'utilitza juntament amb un esquer alimentari. A Catalunya l'ús d'aquest paranys té dues finalitats: la captura massiva d'adults, i el seguiment de vol i dels nivells poblacionals. Per a la captura massiva d'adults s'instal·la varies xarxes de paranys amb una separació de 50 metres entre trampa i trampa. D'aquesta manera s'evita la dispersió i colonització de noves palmeres. Per a fer el seguiment de vol i dels nivells poblacionals es necessari col·locar com a mínim dues bateries de paranys per zona, amb les dades obtingudes es pot calcular el moment idoni per a fer les aplicacions fitosanitàries corresponents (Departament d'Agricultura de la Generalitat de Catalunya, 2010).

Els mètodes químics es basen en productes químics per controlar la població de la plaga. Els que s'usen són insecticides sistemàtics perquè són capaços de què els seus principis actius penetrin pels teixits i arribin a la sàvia que recorre tota la planta. Els productes que s'utilitzen a Catalunya autoritzats en el Registre Oficial de Productes Fitosanitaris, són els següents: Abamectina 1,8% EC, Clorpirifos 48% EC, Imidacloprid 20% SL i Tiametoxam 25% WG.

Els tractaments fitosanitaris poden ser de caire preventiu quan la palmera no està afectada o de caire curatiu quan la plaga ja està instal·lada. La periodicitat en l'aplicació dependrà del tipus d'insecticida i els tractaments es realitzaran entre l'inici de la primavera i finals de la tardor.

El Clorpirifos i l'Imidacloprid s'apliquen directament a la corona de fulles mitjançant un polvoritzador, procurant entollar bé la part interna de la base de les fulles, en especial a l'ull de la palmera. Aquesta aplicació té una certa eficàcia si el morrut encara no ha entrat a l'interior de la palmera. El Clorpirifos és més perjudicial pel mediambient que l'Imidacloprid perquè està classificat com producte nociu i perillós pel mediambient, sent B (mitjana perillositat) per mamífers i aus i C (molt perillós) per peixos i abelles; l'Imidacloprid és A (innocu) per peixos i C (molt perillós) per les abelles.

L'Abamectina, el Tiametoxam i l'Imidacloprid s'apliquen per el mètode d'endoteràpia, és a dir, injectant el producte directament en el sistema vascular de la planta a través del tronc. Les principals característiques són que la seva efectivitat persisteix durant un any,

baix consum d'aigua i baix impacte ambiental, ja que actua directament sobre la plaga i al estar localitzat dins l'exemplar tractat, no perjudica a la resta de comunitats animals. L'Abamectina està classificat com: A (innocu) per les abelles, B (mitjana perillositat) per mamífers i aus i C (molt perillós) per peixos. El Tiametoxam està classificat com a perillós pel organismes aquàtics i pels artròpodes no objecte de tractament.

Un dels inconvenients en la utilització de productes químics és l'elevada toxicitat que presenten pels organismes aquàtics i per les abelles. Per als mamífers i les aus aquest productes presenten una toxicitat mitjana. Les palmeres afectades pel morrut de les palmeres es localitzen en els jardins tant públics com privats dins dels nuclis urbans. Aquesta localització causa que les persones i els animals domèstics estiguin exposats a aquestes substàncies químiques quan les palmeres són tractades. Aquest fet suposa un risc toxicològic per a les persones tenint en compte també el risc ambiental quan aquestes substàncies són alliberades en el medi. Es poden minimitzar aquest riscos buscant mètodes alternatius de control com per exemple l'ús de bioinsecticides.

La utilització dels bioinsecticides en el control biològic de les plagues, tenen l'avantatge de què no són tòxics per a les persones i pel medi ambient. Els bioinsecticides combaten directament a l'insecte perjudicial sense provocar danys als altres organismes no diana. Els insecticides químics en canvi, maten indistintament a tots els insectes siguin diana o no, això genera l'aparició de plagues secundàries a causa del desequilibri ecològic generat en el sistema. La reiterada aplicació de substàncies químiques per eliminar una plaga, genera a la llarga una resistència de l'insecte al producte, i obliga d'aquesta manera a sintetitzar nous productes molt més potents i tòxics per poder continuar controlant la plaga. Tot al contrari passa amb els bioinsecticides perquè són organismes vius i aquest fet impossibilita la generació de resistències per part de l'insecte nociu. Un altre factor a tenir en compte és que tenen la capacitat de reproduir-se i d'aquesta manera poden romandre més temps en l'ambient sense la necessitat de fer noves aplicacions.

No s'ha trobat cap enemic natural fora del seu país d'origen per tal de combatre el *R.ferrugineus*. S'ha trobat naturalment infectat per un fong entomopatògen anomenat *Beauveria bassiana*,a però es desconeix el seu procés d'infecció (Güerri-Agulló et al., 2009). L'única via estudiada per al seu control és la utilització dels nemàtodes

entomopatògens. L'espècie autoritzada per la seva comercialització és *Steinernema carpocapsae*, que es pot aplicar juntament amb un producte orgànic biodegradable anomenat quitosano amb el principi actiu N-acetil-glucosamina. Aquest producte activa els mecanismes de defensa en la palmera (Hädwiger Löschke, 1981), augmentant la lignificació, i estimula el desenvolupament de les arrels (Ait Barka, 1981). Un dels possibles inconvenients de la utilització de nemàtodes entomopatògens per a combatre el morrut, és la possibilitat de què aquests siguin depredats pels àcars presents sota les èlitres dels adults de *R. ferrugineus*.

Un dels desavantatges de la utilització de nemàtodes entomopatògens, com passa amb altres bioinsecticides, és el difícil maneig i aplicació del producte ja que els nemàtodes són molt sensibles i una mala aplicació genera una nul·la efectivitat del tractament. Un altre problema, és que la seva especificitat d'acció pot comportar que no hagin suficients agents biològics per a cada plaga. Els bioinsecticides actuen més lentament que els insecticides químics i requereixen un seguiment exhaustiu per controlar la correcta eficàcia del tractament.

Els nemàtodes entomopatògens

Els nemàtodes entomopatògens són paràsits obligats d'insectes, i presenten una relació simbiòtica amb una bactèria que els dona una enorme potencialitat com a bioinsecticides. Aquests nemàtodes pertanyen a dues famílies de l'ordre Rhabditida: la família Steinernematidae i la Heterorhabditidae. El cicle de vida de totes dues és molt similar (figura 10) (Garcia del Pino, 2005).

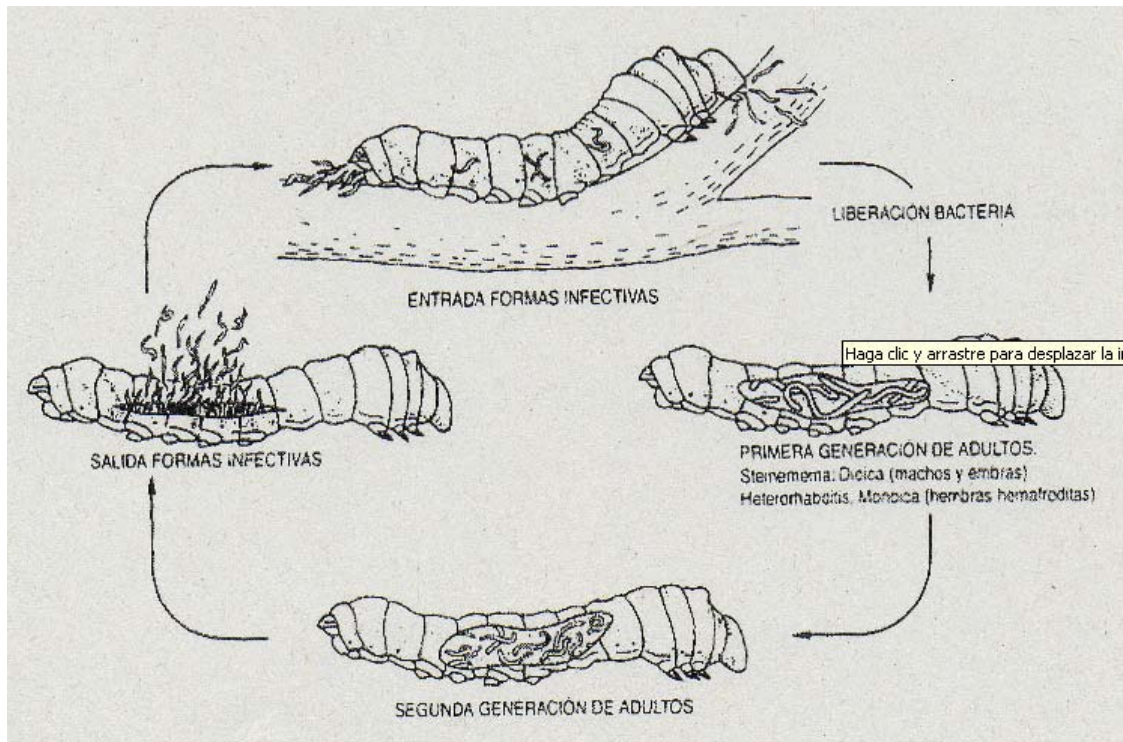


Figura 10: Cicle de vida dels nemàtodes entomopàtogens (Garcia del Pino, 2005)

Aquest nemàtodes només poden viure fora de l'insecte en forma infectiva. Aquesta correspon a un tercer estadi juvenil infectiu. En aquest estadi, els nemàtodes no s'alimenten, tenen tant la boca com l'anus tancats. Són precisament aquestes formes infectives les que s'encarreguen de buscar l'insecte, i ho fan detectant els productes d'excreció dels mateixos, de manera que els utilitzen com a rastre. Aquest nemàtodes transporten en l'intestí unes 200 cèl·lules d'una bactèria simbiota del gènere *Xenorhabdus* (Steinernematidae) o *Photorhabdus* (Heterorabditidae) (Garcia del Pino, 2005).

Un cop localitzen l'insecte, l'entrada té lloc per les obertures naturals, és a dir, la boca, l'anus o els espiracles, i quan es troba dins el sistema digestiu o traqueal de l'insecte, entra a l'hemocel i allibera les bacteries simbiotes que transporta en el seu interior. Aquestes últimes es multipliquen ràpidament en la hemolimfa, i maten el insecte per septicèmia, aproximadament 24 a 48 hores després (Garcia del Pino, 2005).

Quan l'insecte mor és el moment en el que el nematode comença a alimentar-se de la bactèria, i va mudant fins arribar al quart estadi, arribant a l'estadi d'adults, mascles i femelles de primera generació. Aquest es reproduïxen donant una segona generació, i

així successivament fins que s'esgota l'aliment del cadàver de l'insecte. Quan això passa, el segon estadi del nematode emmagatzema les bactèries en una vesícula del tub digestiu, muda i es converteix en forma infectiva. Aquestes sortiran del cadàver de l'insecte, passant al medi per localitzar un nou insecte per parasitar-lo (Garcia del Pino, 2005).

Els nemàtodes de la família Heterorabditidae es diferencien dels Steinernematidae en que la primera generació d'adults es monoica, composta únicament per femelles hermafrodites. El bacteri que transporten pertany al gènere *Photorhabdus*, el qual presenta luminescència (Garcia del Pino, 2005).

Hi ha diferents característiques dels nemàtodes que poden limitar la seva eficàcia. Per exemple, el fet de que els nemàtodes entrin normalment per obertures naturals pot suposar un obstacle per als mateixos, ja que es poden donar casos en que l'insecte defeqüi freqüentment, que tingui unes mandíbules fortes que els provoqui danys i que es netegi, de manera que el nombre de nemàtodes que entrarà al insecte es veurà disminuït. Per una altra banda, les interaccions amb el sistema immunitari de l'insecte també poden afectar la seva eficàcia, ja que aquest identifica els nemàtodes com a cossos estranys i els encapsula. Aquest comportament s'ha observat en alguns ortòpters, coleòpters, dípters i lepidòpters. Tot i que aquesta capacitat és limitada, comporta que alguns dels nemàtodes quedin inactivats abans de l'alliberament del bacteri (Garcia del Pino, 2005).

El comportament de recerca dels nemàtodes també pot afectar la seva eficàcia a l'hora de parasitar, ja que aquest variarà depenent de l'espècie. Algunes espècies com és *Steinernema carpocapsae* presenten un comportament "d'emboscada": romanen quiets quan s'apliquen i es comencen a moure en passar un insecte. Pel que fa als desplaçaments en el sòl, es troba normalment en les capes superficials, i si es mou tendeix a fer-ho cap amunt. Per una altra banda, podem trobar també nemàtodes "navegants", que des del primer moment es desplacen buscant un possible hoste. Aquest és el cas de *Heterorhabditis bacteriophora*. Aquest es troba normalment en capes més profundes del sòl (8 – 35 cm), i quan es mou tendeix a fer-ho cap avall, però també es mou per tota la columna del sòl (Garcia del Pino, 2005).

Finalment, la supervivència en el medi és un factor important a considerar. Aquesta variarà en funció de l'espècie, el seu comportament, la seva taxa metabòlica i la quantitat de reserves de nutrients de les que disposi, així com altres factors biòtics i abiòtics. Altres factors com la temperatura, l'humitat i la concentració de sals o plaguicides també poden tenir una influència sobre els nemàtodes: toleren molt bé les temperatures baixes, de fet, es conserven en fred, però les temperatures altes (32°C) poden provocar efectes adversos sobre la seva reproducció. Els nemàtodes són molt sensibles a la dessecació, ja que necessiten una pel·lícula d'aigua al seu voltant per poder moure's (Garcia del Pino, 2005).

Els nemàtodes entomopatògens són especialment interessants per combatre plagues d'insectes per diferents motius: es tracta d'un sistema molt segur, ja que els nemàtodes són letals per molts insectes, però molt segurs per a l'home, les plantes i altres animals, ja que no contaminen el medi ambient. No cal utilitzar equips de protecció personal, no calen períodes de seguretat i no deixen residus ni contaminen les aigües subterrànies. També destaquen per la seva fàcil aplicació amb els aparells convencionals. Triguen unes 24–48 hores en matar l'insecte, i són capaços de trobar-lo activament en hàbitats críptics, com poder ser sòls i galeries. Cal destacar que tenen un avantatge molt gran respecte a la resta de mètodes de lluita ja que amb la reproducció del nematode en l'interior de l'insecte pot haver-hi un efecte multiplicador de la dosi inicial aplicada (Garcia del Pino, 2005).

1.4.- Objectius

L'objectiu principal d'aquest treball és avaluar la susceptibilitat de *Rhynchophorus ferrugineus* als nemàtodes entomopatògens amb la finalitat de valorar la seva efectivitat com agent de control biològic. Com objectiu secundari és avaluar el possible potencial depredador de l'àcar *Centrouropa almerodai* sobre els nemàtodes entomopatògens per veure si poden afectar negativament en la utilització dels nemàtodes com bioinsecticides.

2. Susceptibilitat del *Rhynchophorus ferrugineus* als nemàtodes entomopatògens.

La finalitat del present estudi es determinar quina de les 4 espècies de nemàtodes entomopatògens proposades és la més eficaç per combatre al *R. ferrugineus*. Actualment és comercialitza una soca de *Steinernema carpocapsae* en el control biològic del morrut sense haver-se fet cap estudi de susceptibilitat entre les diferents espècies de nemàtodes entomopatògens existents. També es vol conèixer la susceptibilitat dels adults per sexes.

Actualment existeix diverses publicacions sobre el control biològic del *R. ferrugineus* amb *S. carpocapsae* (Gómez, et al., 2008) (Llacer, et al., 2009) i amb *H. bacteriophora* (Atakan, et al., 2009) en condicions de camp. Pel que fa a *S. feltiae* i *Steinernema sp* no n'hi ha publicat cap estudi de susceptibilitat en *R. ferrugineus* ni en camp ni en laboratori.

2.1.- Materials i mètodes

Nemàtodes

Els nemàtodes escollits per a dur a terme aquest assaig varen ser *Steinernema carpocapsae* (soca B14), *Heterorhabditis bacteriophora* (soca DG46), *Steinernema sp* (Soca D122), *Steinernema feltiae* (soca D114), més dues soques comercials de *Steinernema carpocapsae* (soca IDEBIO) i (soca Bioverd). Es van escollir aquestes espècies perquè són algunes de les que s'han aïllat a Espanya i pel fet de que són algunes amb les que es treballa més freqüentment, i per tant, estan molt ben caracteritzades. Els nemàtodes utilitzats van ser criats en larves de l'últim estadi de l'arna de la cera, *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Galleridae) a 25°C, d'acord amb els procediments descrits per Woodring i Kaya (1998). Les formes infectives que es van obtenir es van emmagatzemar a 7°C entre 7 i 14 dies abans de ser utilitzats. Abans de la seva aplicació es van deixar aclimatar a temperatura ambient (21-23°C) durant 30 minuts.

Rhynchophorus ferrugineus

Els exemplars de *R. ferrugineus* que es van utilitzar en aquest assaig es van obtenir de diverses palmeres de l'espècie *Phoenix canariensis* a les comarques del Maresme i Baix Penedès. Es van extreure in-situ de la valona i de la base de les fulles i es van conservar en caixes amb el propi substrat de la palmera. Les pupes es van descartar dels assajos degut a la seva fragilitat i dificultat de trobar exemplars en condicions.

Assaig de laboratori

L'assaig es va preparar en plaques de Petri de 8,5 cm de diàmetre amb substrat format per serradura de palmera esterilitzada en autoclau fins cobrir tres quartes parts.

La dosi de nemàtodes utilitzada va ser de 500.000 nemàtodes/m², de manera que tenint en compte la superfície de la placa, es va calcular que la dosi a introduir era de 2837 nemàtodes per placa. Per a cada soca de nematode, es van fer 2 sèries de 15 plaques cadascuna. A cada placa es va col·locar 1 individu (una larva o un adult). Es va realitzar unes altres 2 sèries control de 15 plaques amb cada un dels estadis (larves i adults). Es varen col·locar en capsles amb tapa per conservar la humitat. Finalment, es van dipositar en una càmera a 23°C fins que l'assaig va finalitzar. Tot l'experiment es va repetir dues vegades.

Per avaluar l'efectivitat dels nemàtodes es van efectuar 4 controls de mortalitat: al tercer, al sisè, al novè i al dotzè dia de la infecció. Un cop passat aquest temps, es van dissecar tots els exemplars morts per comprovar que haguessin estat infectats per nemàtodes (figura 11). La funció d'aquesta dissecció va ser eliminar possibles factors confusos, ja que hi ha fongs entomopatògens que també parasiten els insectes i que en provoquen la mort, podent crear biaixos en els resultats.



Figura 11: Cadàver de larva de *R. Ferrugineus* infectat per *S. carpocapsae* en l'assaig de susceptibilitat. Es pot observar la sortida massiva de formes infectives.

Anàlisi estadístic

Previ al tractament de les dades es va avaluar si aquestes seguien una distribució normal. Donat que el resultat va ser negatiu, les dades es van avaluar mitjançant la prova no paramètrica d'en KRUSKAL-WALLIS per a veure si hi havia diferències significatives de mortalitat per a les diferents soques de nemàtodes. Es va utilitzar un nivell de significació de $P \leq 0,05$.

2.2.- Resultats

El tractament de les dades recollides ens mostra que hi ha diferents percentatges de mortalitat entres els diferents estadis de *R. ferrugineus* i entre les diferents soques de les espècies de nemàtodes utilitzades (figura 12).

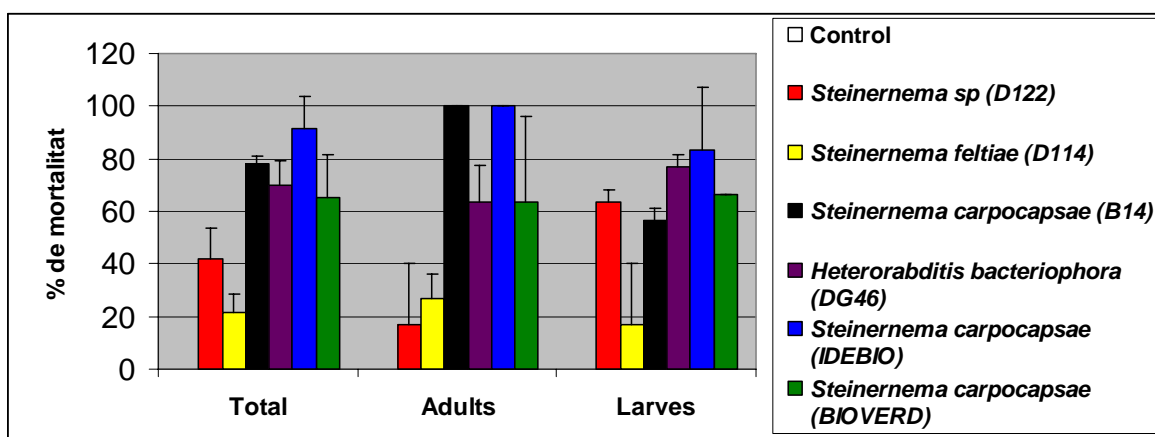


Figura 12: Percentatge de mortalitat per estadis del *R. ferrugineus* (les barres mostren les mitjanes de mortalitat, els colors les diferents espècies de nemàtodes i les barres d'error, la desviació típica).

Si s'observen els resultats obtinguts al finalitzar l'assaig, 12 dies després de la infecció, es pot veure que hi ha diferències significatives entre la mortalitat total del *R. ferrugineus* produïda per les diferents soques de nemàtodes (Kruskal-Wallis: $P=0,008$). La soca comercial IDEBIO (*S. carpocapsae*), és la que més mortalitat produeix dins de la seva mateixa espècie, B14 (*S. carpocapsae*) (Kruskal-Wallis: $P=0,05$) i BIOVERD (*S. carpocapsae*) (Kruskal-Wallis: $P=0,05$); i entre les altres espècies estudiades: DG46 (*H. bacteriophora*) (Kruskal-Wallis: $P=0,05$), D122 (*S. glaseri* group) (Kruskal-Wallis: $P=0,05$) i D114 (*S. feltiae*) (Kruskal-Wallis: $P=0,05$). La mortalitat produïda per la soca

DG46 no té diferències significatives amb les soques B14 (Kruskal-Wallis: $P=0,127$) i BIOVERD (Kruskal-Wallis: $P=0,658$), en canvi, totes 3 soques són significativament més gran que la produïda per D122 (Kruskal-Wallis: $P=0,05$) i D114 (Kruskal-Wallis: $P=0,05$). La mortalitat produïda per la soca D122 és significativament més gran a la produïda per D114 (Kruskal-Wallis: $P=0,05$).

Per l'estadi adult hi ha diferències significatives en la mortalitat produïda per les diferents soques (Kruskal-Wallis: $P=0,007$). Les soques més virulentes amb mortalitat màxima són IDEBIO i B14, totes dues són significativament més gran a la produïda per: DG46 (Kruskal-Wallis: $P=0,001$), BIOVERD (Kruskal-Wallis: $P=0,001$), D122 (Kruskal-Wallis: $P=0,037$) i D114 (Kruskal-Wallis: $P=0,037$). La mortalitat produïda per DG46 i BIOVERD és la mateixa sent significativament més gran que la produïda per D122 (Kruskal-Wallis: $P=0,05$) i D114 (Kruskal-Wallis: $P=0,05$). La mortalitat produïda per *S. gliseri group* no és significativament diferent a la produïda per *S. feltiae* (Kruskal-Wallis: $P=0,376$).

Per l'estadi larvari hi ha diferències significatives entre les diferents soques (Kruskal-Wallis: $P=0,008$). La mortalitat produïda per IDEBIO no és significativament diferent a la produïda per DG46 (Kruskal-Wallis: $P=0,513$), en canvi, totes dues són significativament més elevades que les produïdes per B14 (Kruskal-Wallis: $P=0,05$) i D114 (Kruskal-Wallis: $P=0,05$); i significativament iguals amb les soques BIOVERD (Kruskal-Wallis: $P=0,102$; $P=0,121$) i D122 (Kruskal-Wallis: $P=0,121$). Les soques BIOVERD, D122 i B14 són significativament iguals (Kruskal-Wallis: $P=0,102$; $P=0,08$), però totes 3 són significativament diferents a la soca D114 (Kruskal-Wallis: $P=0,037$; $P=0,05$; $P=0,05$).

2.3.- Discussió

Els anàlisis estadístics realitzats mostren que les espècies *S. carpocapsae* i *H. bacteriophora* són les que produeixen significativament més mortalitat que les espècies *Steinernema sp.* i *S. feltiae*. La soca que més mortalitat produeix és la IDEBIO (*S. carpocapsae*) que és significativament més alta que les altres soques de *S. carpocapsae* i *H. bacteriophora* utilitzades en aquest assaig. La mortalitat produïda per *S. sp* és significativament molt més baixa que *S. carpocapsae* i *H. bacteriophora* però es significativament superior a la mortalitat produïda per *S. feltiae*.

Així doncs, es confirma que la soca comercial de *S. carpocapsae* (IDEBIO), la que actualment s'utilitza pel control biològic del *R. ferrugineus*, és la més eficaç tant en adults, produint el 100% de mortalitat, com en les larves amb un 80%. Aquest resultats són similars als trobats per Gómez Vives (2008), que va obtenir una mortalitat del 100% dels adults alliberats dins la palmera una hora després del tractament amb *S. carpocapsae*. En el cas de les larves, la mortalitat produïda per *S. carpocapsae* al setè dia de la seva aplicació és de 67,44%, de les que restaven vives, un 64,24% van morir en el transcurs de 20 dies. Segons Llacer (2009), *S. carpocapsae* aplicat amb quitosano (producte orgànic biodegradable) és efectiu per tots els estadis de *R. ferrugineus* i assegura que la seva alta efectivitat es deguda que el nematode penetra dins la corona buscant activament a nou hostes de morrut per infectar. Aquesta darrera afirmació difereix de la idea clàssica que *S. carpocapsae* segueix una estratègia d'emboscada alhora d'infectar nou hostes (García del Pino, 2006). Els autors Gómez Vives (2008) i Llacer (2009), coincideixen en que el control biològic amb *S. carpocapsae* és efectiu tant per tractaments preventius com curatius. L'aplicació de *S. carpocapsae* poc abans de l'època de vol del morrut (abril – maig, setembre – octubre) ajuda a frenar la plaga ja que afecta: (1) els estats immadurs de la vella generació dins la palmera, (2) els adults abans de la oviposició, i (3) les larves joves de la nova generació (Llacer et al., 2009). En els resultats obtinguts per Martínez de Altube (2010) demostren que no hi ha diferències significatives en la mortalitat de *R. ferrugineus* produïda per *S. carpocapsae* (control biològic) i Imidacloprid (control químic), sent tots dos tractaments molt efectius per combatre la plaga. Per tant, el control biològic del morrut és una alternativa viable per substituir els tractaments químics menys respectuosos amb el medi ambient.

Una segona opció viable en el control del *R. ferrugineus* amb nemàtodes és la utilització de *H. Bacteriophora*, menys potent que la soca *S. carpocapsae* (IDEBIO), però de eficàcia significativament igual a les soques de *S. carpocapsae* (B14 i BIOVERD). En els resultats obtinguts, *H. bacteriophora* és més eficaç amb un 76,67% de mortalitat per l'estadi larvari, i un 63,33% per l'estadi adult. Els resultats obtinguts en la taxa de mortalitat de les larves, és molt semblant a la descrita per Atakan (2009) amb un 69%; en canvi, difereix considerablement amb la taxa mortalitat en els adults que és del 2%. Aquesta diferència es deguda a que els assajos realitzats per Atakan es van fer en el camp, on les condicions no son controlables com en el laboratori. *H. bacteriophora* produeix taxes elevades de mortalitat en les larves de *R. ferrugineus*, fet que limita la

població dins de les palmeres afectades, en canvi, la poca mortalitat produïda en els adults, permet la continua expansió de la plaga (Atakan, et al., 2009).

Les soques de *Steinernema sp.* (D122) i *S. feltiae* (D114) que s'han utilitzat per a dur a terme aquest assaig han demostrat que no són una opció eficaç pel control de *R. ferrugineus* degut a què mostren poca susceptibilitat a l'espècie. Per a properes investigacions sobre la susceptibilitat del morrut de les palmeres als nemàtodes entomopatògens s'hauria de provar altres soques diferents de *S. sp* i *S. feltiae* per a veure si poden arribar a ser igual d'efectives que les soques de *S. carpocapsae* i *H. bacteriophora* utilitzades en aquest assaig.

3. Avaluació de la depredació *Steinernema carpocapsae* a partir de l'àcar *Centroupeda almerodai* present sota els èlitres de l'adult de *Rhynchophorus ferrugineus*.

L'objectiu secundari d'aquest treball és avaluar el possible potencial depredador de l'àcar *Centroupeda almerodai* (Acari: Acaridae) sobre els nemàtodes entomopatògens. Un dels mètodes de control biològic utilitzats actualment per combatre el morrut és la utilització de l'espècie de nematode *S. carpocapsae*. Les seves formes juvenils infectives penetren dins l'insecte a través dels orificis naturals, com per exemple, la boca, l'anús o els espiracles. L'àcar *C. almerodai* està associat als adults del *R. ferrugineus*, localitzant-se sota els seus èlitres molt a prop dels espiracles (figura 13), un dels punts d'entrada natural dels nemàtodes. Els nemàtodes poden ser depredats per fongs i per altres invertebrats com ara els àcars (Ekmen et al., 2010). Es desconeix la relació interespecífica entre *C. almerodai* i *R. ferrugineus*. És possible que aquest àcar, present en els èlitres, pugui depredar l'*S. carpocapsae* que intenta penetrar dins de l'insecte a través dels espiracles, causant una menor eficiència d'aquest mètode de control. Ekmen et al (2010) han realitzat un estudi on demostra que l'àcar *Sancassania polyphyllae* (Acari: Acaridae) depreda els nemàtodes entomopatògens utilitzats en control biològic.



Figura 13: Presència de l'àcar *C. almerodai* sota els èlitres dels adults de *R. ferrugineus*.

3.1.- Materials i mètodes

Nemàtodes

L'espècie de nematode escollit per dur a terme aquest assaig va ser *Steinernema carpocapsae* que és la que es comercialitza i actualment és la que s'utilitza pel control biològic del morrut. Els nemàtodes utilitzats van ser criats en larves de l'últim estadi de l'arna de la cera, *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Galleridae) a 25°C, d'acord amb els procediments descrits per Woodring i Kaya (1998). Les formes infectives que es van obtenir es van emmagatzemar a 7°C de 7 a 14 dies abans de ser utilitzats. Abans de la seva aplicació es van deixar aclimatar a temperatura ambient (21-23°C) durant 30 minuts.

Centrouropoda almerodai

Els exemplars dels àcars *Centrouropoda almerodai* que es van utilitzar en aquest assaig es van obtenir de diversos adults de *R. ferrugineus*. Es van extreure en el laboratori de sota dels èlitres de les ales dels adults i es van dipositar en plaques de Petri de 9 cm de diàmetre amb un preparat d'agar-agar per mantenir la humitat i evitar la seva dessecació. Es van conservar durant 96 hores a una temperatura de 18°C amb la finalitat de mantenir els àcars en dejú.

Assaig de laboratori

L'assaig es va preparar en plaques de Petri de 3cm de diàmetre amb una base formada per dos papers de filtre estèrils. La dosi de *S. carpocapsae* utilitzada va ser de 100 nemàtodes per placa tenint cura de mantenir el paper de filtre humit, però evitant la circulació d'aigua lliure perquè els àcars no s'ofeguin. Es van realitzar dos sèries, la primera sèrie control, es va introduir 100 nemàtodes en cada placa, i la segona, es va col·locar a cada placa 20 àcars i els 100 nemàtodes. Cada sèrie va constar de 20 plaques i l'experiment es va repetir tres cops. Les plaques es van guardar dins d'una caixa amb tapa per mantenir la humitat i es van dipositar en una cambra a 23°C durant 6 dies.

Per avaluar la depredació dels nemàtodes es van obrir totes les plaques al sisè dia i mitjançant una lupa es va realitzar el recompte dels nemàtodes vius.

Anàlisi estadístic

Previ al tractament de les dades, es van avaluar si aquestes seguien una distribució normal. Les dades que si la seguien, es van avaluar mitjançant un T-Test d'un factor (ONEWAY, SPSS – PC) per a avaluar si existien diferències significatives en el nombre total d'individus entre el tractament control i amb àcars. Les dades que no seguien una distribució normal, es van avaluar mitjançant la prova no paramètrica d'en KRUSKAL-WALLIS per veure si hi havia diferències significatives en la supervivència dels nemàtodes entre el tractament control i amb àcars.

3.2.- Resultats

El tractament de les dades recollides ens mostra que hi ha diferències en el nombre total de nemàtodes presents en el tractament control i el tractament amb *C. almerodai* (figura 14). També hi ha diferències en la taxa de supervivència de *S. carpocapsae* en ambdós tractaments (figura 15).

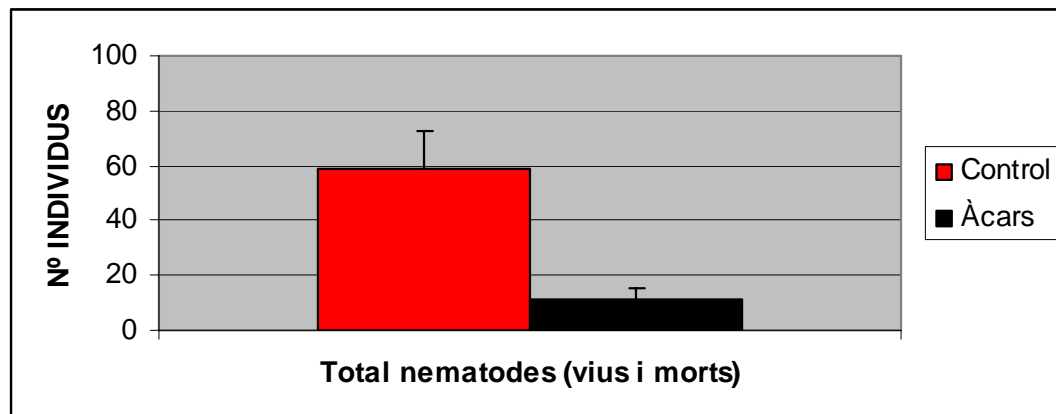


Figura 14: Nombre total de nemàtodes (vius i morts) presents en el dos tractaments (les barres mostren els individus totals, els colors els diferents tractaments i les barres d'error, la desviació típica).

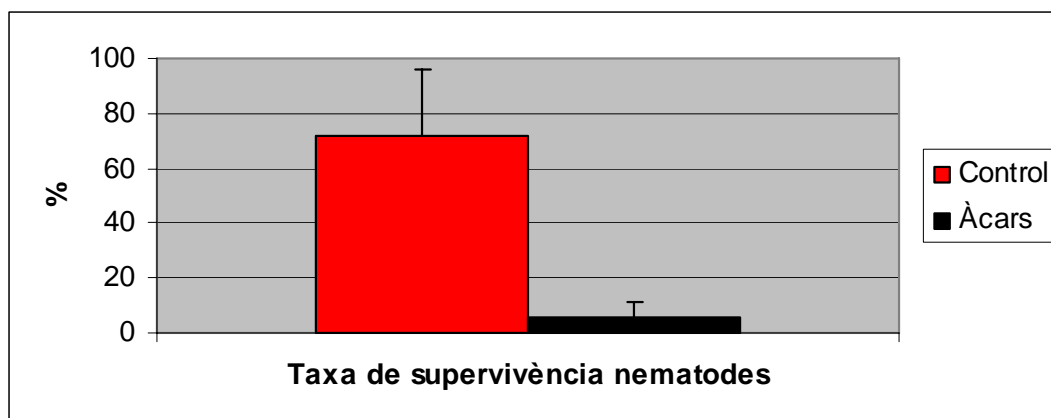


Figura 15: Percentatge de supervivència dels nemàtodes en el dos tractaments (les barres mostren el percentatge de supervivència, els colors els diferents tractaments i les barres d'error, la desviació típica).

Si s'observen els resultats obtinguts al cap de 6 dies de l'assaig, es pot veure que hi ha diferències significatives en el nombre total de *S. carpocapsae* (vius i morts) entre els dos tractaments (T-test. $F=66,804$, $P=0,004$), sent major el tractament control respecte al tractament amb *C. almerodai*. De la mateixa manera, hi ha diferències significatives entre la taxa de supervivència de *S. carpocapsae*, sent més alta en el tractament control respecte al tractament amb *C. almerodai* (Kruskal-Wallis: $P=0,05$).

3.3.- Discussió

Com s'ha vist en els resultats, el número de *S. carpocapsae* i la seva supervivència és molt menor en el tractament amb *C. almerodai* que en el tractament control. Basant-nos en aquest resultat es pot veure que existeix una relació de depredació entre *C. almerodai* i *S. carpocapsae*. Ekmen et al (2010) van trobar un efecte negatiu significatiu en el número de nemàtodes juvenils infectius quan els van col·locar a prop de 10 àcars de *Sancassania polyphyllae*. D'altra banda van comprovar que si la distància entre els àcars i el juvenils infecciosos era gran, la taxa de depredació per part dels àcars es reduïa o era inexistent, fet que demostra que els àcars no són molt eficients a l'hora de trobar els juvenils infecciosos quan estan molt separats. No obstant això, la supervivència de les formes infectives va disminuir quan en el sòl havia presència de *S. polyphyllae*.

En l'assaig de susceptibilitat de *R. ferrugineus* als nemàtodes entomopatògens es va observar que diverses soques de diferents espècies eren molt efectives per combatre el morrut. Les diverses soques de *S. carpocapsae*, una d'elles comercial, van produir una

mortalitat del 100% a l'estadi adult. La elevada efectivitat d'aquestes soques evidencien que la relació de depredació entre *C. almerodai* sobre *S. carpocapsae*, no es suficient perquè es vegi afectat el seu potencial com a bioinsecticida. El motiu perquè els àcars no influeixen negativament en la efectivitat dels nemàtodes és degut que aquest només es localitzen i es concentren a prop dels espiracles (sota els èlitres dels adults), que es un dels tres punts naturals d'entrada que tenen els nemàtodes per parasitar. Els altres dos punts que són la boca i l'anús no hi ha presència d'àcars i es possible que siguin les vies d'entrada dels nemàtodes sense perill de ser depredats. Per corroborar-ho en treballs posteriors s'haurien de fer assajos per comprovar per quin dels tres orificis naturals del morrut entren els nemàtodes i determinar si hi ha diferències significatives entre elles.

Un dels avantatges del control biològic respecte altres mètodes és la seva capacitat dels seus agents per a reproduir-se i tornar a infectar més insectes diana sense la necessitat d'aplicar nous tractaments. Les formes juvenils infectives dels nemàtodes no tenen dificultats per infectar i matar als adults de *R. ferrugineus*, però hi ha la possibilitat de que els àcars puguin depredar les noves formes juvenils infectives que surten de l'interior de l'adult, afectant negativament a la reinfecció de nous hostes.

4.- Conclusions

El morrut de les palmeres (*R. ferrugineus*) és susceptible als nemàtodes entomopatògens. La soca comercial *S. carpocapsae*, la que s'utilitza actualment, és la més efectiva respecte a les altres soques que s'han estudiat en aquest treball. La seva eficàcia és similar a la del Imidacloprid, un dels productes més utilitzats per combatre químicament la plaga. L'ús de *S. carpocapsae* com a bioinsecticida és una alternativa viable als mètodes químics per controlar la plaga del morrut de les palmeres. La majoria de palmeres atacades pel morrut es localitzen en zones urbanes i la població queda molt exposada als productes químics que es fan servir per tractar-les. L'ús de *S. carpocapsae* per tractar les palmeres afectades, minimitza el risc per a la salut humana perquè els nemàtodes entomopatògens no són perillosos pels humans i pels altres vertebrats. Els impactes generats pels productes químics en el medi ambient també són eliminats amb l'ús de nemàtodes entomopatògens perquè no contaminen el medi aquàtic i no afecten a les abelles, insectes beneficiosos que juguen un paper molt important en la pol·linització.

La eficàcia de *S. carpocapsae* pel control de *R. ferrugineus*, no es veu afectada per la presència de l'àcar *C. almerodai* localitzat a sota els èlitres dels adults. S'ha vist que els àcars depreden a les formes juvenils infectives, però aquest fet no impedeixen que els nemàtodes facin la seva funció com bioinsecticides, tal i com s'ha observat en l'assaig de susceptibilitat.

L'estudi de la susceptibilitat del morrut de les palmeres als nemàtodes entomopatògens, és un dels molts exemples de la eficàcia que poden tenir els agents biològics per a controlar les plagues. En el camp de l'agricultura, és molt important poder controlar les plagues per evitar que aquestes malmetin la collita, arribant a generar pèrdues econòmiques en els països desenvolupats, i episodis de fam en els països en vies de desenvolupament. Els mètodes químics utilitzats en l'agricultura convencional, practicada arreu del món, fan que aquesta sigui insostenible generant uns impactes negatius per al medi ambient i per a la salut humana. La investigació de nous agents biològics i la seva posterior substitució pels agents químics actuals, poden representar un canvi substancial en l'agricultura convencional enfocant-lo d'aquesta manera cap a una agricultura més sostenible, l'ecològica.

5.- Pressupost

A continuació es presenten els costos que suposaria una repetició de la investigació. S'han inclòs els costos de tot el material, incloent el dels nemàtodes entomopatògens i de les larves de *G. mellonella*, per estimar el cost real de la investigació si s'hagués de realitzar de forma independent.. Remarcar que no s'han estimat els costos dels materials inventariable de laboratori utilitzats, com poden ser el microscopi, lupa, càmeres de comptatge, etc., ja que es pressuposa que es disposa de tot aquest material.

	<i>PREU (IVA inclòs)</i>	<i>QUANTITAT</i>	TOTAL (Euros)
Material fungible:			
- plaques de Petri 9cm diàmetre (capsa 500 u)	36,01	1	36,01
- plaques de Petri 3cm diàmetre (capsa 1200 u)	69,73	1	69,73
- paper de filtre (paquet 100 fulls 58x58 cm)	35,86	1	35,86
- puntes micropipeta automàtica 1000 µl (paquet 100 u)	13,30	1	13,30
- Larves de <i>Galleria mellonella</i> (capsa 250 larves)	12,73	2	25,46
Nemàtodes entomopatògens			
- <i>Steinernema carpocapsae</i> : IDEBIO [®] , (preparat amb 50 milions de nemàtodes)	35,83	1	35,83
- <i>Steinernema carpocapsae</i> : Bioverd [®] , (preparat amb 50 milions de nemàtodes)	39,41	1	39,41
Recursos humans:			
- Laboratori (sou de becari)	6	444 hores	2664
- Camp (sou de becari)	6	72 hores	432
		TOTAL	3351,6

6.- Bibliografía

Pàgines web

“El palmeral histórico de Elche” Patrimonio de la humanidad por la UNESCO.
<http://www.ayto-elche.es/docs/Patrimonio.pdf> (Novembre 2009)

Publicacions:

Ait Barka, E., Eullaffroy, P., Clément, C., Vernet, G., 2004. Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Rep*, 22:608–614.

Ajuntament de Reus; 2007; *full informatiu novembre 07*. pag: 2-8.

Ayuntamiento de santa Lucia, 1999-2000. El picudo rojo, *Rhynchophorus ferrugineus*, en la palmera canària. Junta de Andalusia

Barranco, P., Peña, J., Cabello, T., 1995. Un nuevo curculiónido tropical para la fauna europea, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790), (Coleoptera: Curculionidae). *Boletín de la Asociación Espanyola de Entomología*, 20: 1-2.

Barranco, P., De La Peña, J.A., Martín, M.M., Cabello, T., 2000. Host rank for *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790)(Coleoptera: Curculionidae) and host diameter. *Bol. San. Veg. Plagas*, 26: 73–78.

Dirección General del Medio Natural, 2006. “El picudo rojo *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier. Dossier informativo”. Gobierno de Canarias.

Ekmen, Z.I., Hazir, S., Cakmak, I., Ozer, N., Karagoz, M., Kaya, H.K. Potential negative effects on biological control by *Sancassania polyphyllae* (Acari: Acaridae) on an entomopathogenic nematode species. *Biological control*, 54: 166 – 171.

- ElGarhy, M.E., 1996. "Field evaluation of the aggregation pheromone of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*, in Egypt". BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE: PESTS & DISEASES , VOLS 1-3: 1059-1064.
- Esteban-Duran, J., Vela, J.L., Beitia-Crespo, F., Jiménez-Álvarez, A., 1998. Biología del curculiónido ferruginoso de las palmeras *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) en laboratorio y campo: ciclo en cautividad, peculiaridades biológicas en su zona de introducción en España y métodos biológicos de detección y posible control (Coleoptera: Curculionidae: Rhynchophorinae). Boletín de Sanidad Vegetal - Plagas, 24 : 737-748.
- Ferry, M., Gómez, S., 2002. The red palm weevil in the Mediterranean Area. Palms, 46 (4): 176-178.
- Gómez Vives, S., Muñoz Irujo, C., Ferry, M., Martínez de Altube, M.M., 2008. Primeros resultados sobre el uso de *Steinernema carpocapsae* (Rhabditidae: Steinernematidae) asociado a quitosano para el control de *Rhynchophorus ferrugineus*, Olivier en palmeras datileras. Boletín de sanidad vegetal, plagas, 34(1): 147 – 149.
- Güerri_Aguló, B., Gómez-Vidal, S., Asensio, L., Barranco, P., Lopez-Llorca, L., 2009. Infection of the red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*) by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: a SEM study. Microscopy research and Technique, 73(7): 714 – 725.
- Hadwiger, L.A., Loschke, D.C., 1981. Molecular communication in host-parasite interactions: hexosamine polymers (chitosan) as regulator compounds in race-specific and other interactions. Phytopathology, 71:756–762.
- Hutson, J.C., 1933. The red weevil of coconut. Department of Agriculture of Ceylon. Leaflet, 22.

- Llacer, E., Martínez de Altube, M.M., Jacas, A.A., 2009. Evaluation of the efficacy of *Steinernema carpocapsae* in a chitosan formulation against the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*, in *Phoenix canariensis*. *Biocontrol*, 54(4): 559 – 565.
- Martín, M.M., Cabello, T., 2005b. Biología y ecología del curculiónido rojo de la palmera, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera: Dryophthoridae). Departamento de Biología Aplicada. Universidad de Almería. Almería: 202.
- Martín, M.M., Barranco, P., De La Peña, J., Cabello, T., 200 1c. Parámetros biológicos de *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera: Curculionidae) en condiciones de cría prolongada. XIX Jornadas de la Asociación Española de Entomología. Badajoz (España): 80.
- Martínez de Altube, M.M., Llacer, E., Dembilio, O., Jacas, J.A., 2010. Field efficacy of imidacloprid and *Steinernema carpocapsae* in a chitosan formulation against the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: curculionidae) in *Phoenix canariensis*. *Pest management science*, 66(4): 365 – 370
- Menon, K.P.V., Pandalai, K.M., 1960. The Coconut Palm A Monograph. Pests: 261-265
- Reginald C (1973) Principal insect pests. In: Coconuts. Tropical Agriculture Series. Longmans, London (GB).
- Salama, H.S., Harndy, M.K., Magd EI-Din, M., 2002. The thermal constant for timing the emergence of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Oliv.) (Coleoptera: Curculionidae). *Anzeiger für Schandtltnskunde*, 75: 26-29.
- Salema, H.S., Abdel-Razek, A.S., 2002. Development of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier), (Coleoptera, Curculionidae) on natural and synthetic diets. *Anzeiger für Schandtltnskunde*, 75: 137-139.

- Sansano Javaloyes, M.P., Gómez Vives, S., Ferry, M., Díaz Espejo, G., 2008. “ Ensayos de campo para la mejora de la eficacia de las trampas de captura de *Rhynchophorus ferrugineus*, Olivier (Coleóptera: Dryophthoridae), picudo rojo de la palmera.” . Centro de investigación de la palmera datilera y los oasis, Estación Phoenix de Elche. Bol.San. Veg. Plagas, 34:135-145.
- Sanz-Elorza, M., 2005. aproximación al listado de plantas vasculares alóctonas invasoras reales y potenciales en las islas Canaria . Lazaroa, 26: 55 – 66.
- Servei de sanitat vegetal., 2010. El morrut de les palmeres (*Rhynchophorus ferrugineus*). Departament d’Agricultura de la Generalitat de Catalunya.
- Vives, JM., Garcia, A., 2006. El morrut de les palmeres (*Rhynchophorus ferrugineus*). Departament d’Agricultura, Alimentació i Acció Rural, Fitxa 56.